

TRANSLATION CERTIFICATION

We, **AD-EX WORLDWIDE**, an industrial translation service founded in 1957, domiciled at 525 Middlefield Road, Suite 150, Menlo Park, California 94025-3458, USA, do hereby certify that:

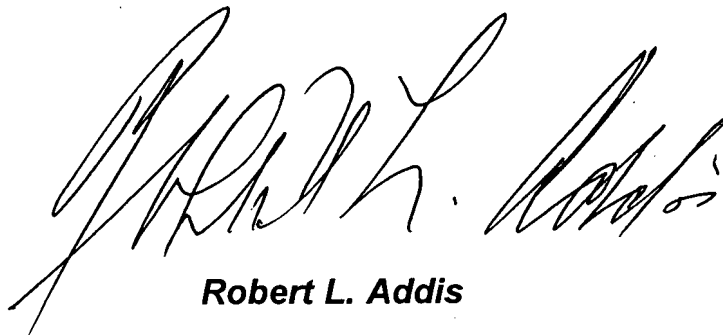
- we are internationally recognized professional translators from Japanese into English;
- we have been serving the public in that capacity since 1957;
- the attached 14-page English text, each of whose pages is identified by JP(A)59-126252, is a translation from Japanese to English entirely performed by us;
- said English translation from Japanese constitutes a complete and accurate description of the entire meaning of the printed portions of the original Japanese-language text identified as

Japanese Patent Application Public Disclosure No. 59-126252
(a 7-page document with pages numbered from 325 to 331)

of which a copy is appended to this English translation.

So declared with such exceptions as may be indicated in the translation.

Thus certified for and on behalf of **AD-EX Worldwide** by its Certifying Officer:

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Robert L. Addis', is written over a horizontal line.

Robert L. Addis

⑬ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭59—126252

⑤ Int. Cl.³

G 01 N 33/50
// C 12 N 15/00
G 01 N 27/26
G 21 H 5/00

識別記号

庁内整理番号
Z 8305—2G
7115—4B
A 7363—2G
8204—2G

⑬ 公開 昭和59年(1984)7月20日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 7 頁)

⑭ DNAもしくはDNA部分分解物の塩基配列
決定法

南足柄市中沼210番地富士写真
フィルム株式会社内

⑯ 特 願 昭58—1335

⑰ 出 願 昭58(1983)1月8日

⑱ 発 明 者 白石久司

⑲ 出 願 人 富士写真フィルム株式会社
南足柄市中沼210番地

⑳ 代 理 人 弁理士 柳川泰男

明 細 書

1. 発明の名称

DNAもしくはDNA部分分解物の
塩基配列決定法

2. 特許請求の範囲

1. DNAもしくはDNA部分分解物に放射性標識を付与したのち、これを塩基特異的切断分解にかけることにより得られる放射性標識を有する切断分解物を支持媒体上で分離展開し、これにより得られる分離展開列を放射線フィルム上に可視画像として得て、該可視画像上に現われた該塩基特異的切断分解物の分離展開位置に基づいてDNAもしくはDNA部分分解物の塩基配列を決定する方法において、

放射性標識を有する塩基特異的切断分解物を支持媒体上で分離展開する際に、DNAもしくはDNA部分分解物をその構成単位である四種類の塩基についてその各々の塩基ごとに特異的に切断して得た切断分解物の混合物を同一の支持媒体上で同時に平行して分離展開し、該混合物の分離展開

列に現われた各分離展開位置を標準として他の分離展開列に現われた塩基特異的切断分解物の分離展開位置を比較同定する工程を含むことを特徴とするDNAもしくはDNA部分分解物の塩基配列決定法。

2. 放射性標識を有する塩基特異的切断分解物および塩基特異的切断分解物混合物を支持媒体上で分離展開する工程を、高分子物質からなるゲル上で電気泳動操作を行なうことにより実施することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載のDNAもしくはDNA部分分解物の塩基配列決定法。

3. 標準の分離展開列を得るための塩基特異的切断分解物混合物として、

1) グアニン (G) 特異的切断分解物、

アデニン (A) 特異的切断分解物、

チミン (T) 特異的切断分解物、および、

シトシン (C) 特異的切断分解物、

を含む混合物を用い、

そして、放射性標識を有する塩基特異的切断分解物として、

- 2) グアニン(G) 特異的切断分解物、
- 3) グアニン(G) 特異的切断分解物 + アデニン(A) 特異的切断分解物、
- 4) チミン(T) 特異的切断分解物 + シトシン(C) 特異的切断分解物、
- 5) シトシン(C) 特異的切断分解物、

からなる四群の放射性標識を有する塩基特異的切断分解物を用いることを特徴とする特許請求の範囲第1項もしくは第2項記載のDNAもしくはDNA部分分解物の塩基配列決定法。

4. 標準の分離展開列を得るための塩基特異的切断分解物混合物として、

- 1) グアニン(G) 特異的切断分解物、
アデニン(A) 特異的切断分解物、
チミン(T) 特異的切断分解物、および、
シトシン(C) 特異的切断分解物、

を含む混合物を用い、

そして、放射性標識を有する塩基特異的切断分解物として、

- 2) グアニン(G) 特異的切断分解物、

性標識高分子物質、その誘導体、あるいはその分解物などをゲル電気泳動などの分離操作にかけてゲル状支持媒体において分離展開し、そのゲル状支持媒体と高感度X線フィルムとを一定時間重ね合わせることにより、該フィルムを感光させ、その感光位置から得られる該ゲル状支持媒体上における放射性標識物質の位置情報を基にして、その高分子物質の分離、同定、あるいは高分子物質の分子量、特性の評価などを行なう方法も開発され、実際に利用されている。

特に近年においては、オートラジオグラフィーは、核酸などのDNA(もしくはそれらのDNAの部分分解物、以下同様)の塩基配列の決定に有効に利用されている。

このオートラジオグラフィーを利用することによりDNAの塩基配列を決定する方法としては、マキシム・ギルバート(Maxam-Gilbert)法、およびサンガー・コールソン(Sanger-Coulson)法が知られている。これらの方法は、DNAが二本の鎖状分子からなる二重らせん構造を有し、かつその

- 3) アデニン(A) 特異的切断分解物、
- 4) チミン(T) 特異的切断分解物、
- 5) シトシン(C) 特異的切断分解物、

からなる四群の放射性標識を有する塩基特異的切断分解物を用いることを特徴とする特許請求の範囲第1項もしくは第2項記載のDNAもしくはDNA部分分解物の塩基配列決定法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、DNAもしくはDNA部分分解物の塩基配列の決定法に関するものである。さらに詳しくは、本発明は、放射線フィルムを用いたオートラジオグラフィーを利用するDNAもしくはDNA部分分解物の塩基配列決定法に関するものである。

支持媒体上において少なくとも一次元的方向に分布して分布列を形成している放射性標識物質の位置情報を得るための方法としてオートラジオグラフィーが既に知られている。

たとえば、蛋白質、核酸などのような生物体由来の高分子物質に放射性標識を付与し、その放射

二本の鎖状分子は、各々四種類の塩基、すなわちアデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、チミン(T)なる塩基を有する構成単位から構成されてこと、そして、この二本の鎖状分子の間はこれら四種類の塩基間の水素結合によって架橋されており、しかも各構成単位間の水素結合は、G-CおよびA-Tの二種類の組合わせのみにて実現しているというDNAの特徴的な構造を巧妙に利用して、その塩基配列を決定する方法である。

たとえば、マキシム・ギルバート法は、次に述べるような方法により実施される。

まず、塩基配列を決定しようとしているDNAあるいはDNAの部分分解物の鎖状分子の一方の側の端部に磷(P)の放射性同位元素を含む基を結合させることにより、その対象物を放射性標識物質とする。次に、この放射性標識物質について所定の化学的な処理を行なうことにより鎖状分子の各構成単位間の結合を特異的に切断して、たとえば、

- 1) グアニン (G) 特異的切断分解物、
- 2) グアニン (G) 特異的切断分解物 + アデニン (A) 特異的切断分解物、
- 3) チミン (T) 特異的切断分解物 + シトシン (C) 特異的切断分解物、
- 4) シトシン (C) 特異的切断分解物、

からなる四種類の塩基特異的切断分解物を得る。

次に、上記の各々の塩基特異的切断分解物をゲル電気泳動法により同一の支持媒体上で平行して分離展開し、各々の塩基特異的切断分解物がそれぞれ一次元方向に分離展開された分離展開列（ただし視覚的には見ることができない）を得る。そして、次に前述の方法を利用してこの分離展開列をX線フィルムなどの放射線フィルム上に可視化してオートラジオグラフを得る。

得られたオートラジオグラフは、上記の例においては、

- 1) グアニン (G) 特異的切断分解物の展開位置を示す分離展開列、
- 2) グアニン (G) 特異的切断分解物の展開位置を示す分離展開列、

展開位置を同定し、各切断分解物の泳動距離はその分子量によって決定されるとの知見に基づいて、放射性同位元素が結合された鎖状分子の端部から一定の位置関係にある塩基を順次決定することにより、対象物の全ての塩基の配列を決定する。

ところで、DNAの塩基配列決定のためのオートラジオグラフィーにおいて、上述のように放射線写真法を利用することにより、放射性標識物質の分子単位的位置情報を視覚的に観測することができるという大きな利点を持っている。

しかしながら、分離展開用の支持媒体として高分子物質からなるゲルを用いる場合にはゲルの内部に泡などが発生しやすく、また、このゲルは自己支持性がないため通常はガラスなどの支持体で挟持した状態にて分離展開を行なうが、それらの支持体の変形などによってもゲルが均一でなくなることも多く、従って、放射性標識物質は支持媒体上で必ずしも一様に分離展開されとは限らない。このような理由から、たとえば、支持媒体の中央付近における分離展開列の移動距離に比べて

置とアデニン (A) 特異的切断分解物の展開位置の双方を示す分離展開列、

- 3) チミン (T) 特異的切断分解物の展開位置とシトシン (C) 特異的切断分解物の展開位置の双方を示す分離展開列、

- 4) シトシン (C) 特異的切断分解物の展開位置を示す分離展開列、

の四種類の分離展開列を可視画像として示すものとなる。

次に、上記の1)および2)の分離展開列をそれぞれ比較することによりグアニン特異的切断分解物とアデニン特異的切断分解物の展開位置を同定する。そしてまた、3)および4)の分離展開列を同様に比較することによりチミン特異的切断分解物とシトシン特異的切断分解物の展開位置を同定する。

すなわち、以上のようにしてグアニン (G) 特異的切断分解物、アデニン (A) 特異的切断分解物、チミン (T) 特異的切断分解物、およびシトシン (C) 特異的切断分解物の各切断分解物の展

開列の移動距離が相対的に短いといった、いわゆるスマイリング効果がしばしば現れる。あるいは、電気泳動により分離展開する場合において電圧が支持媒体全体に均一に印加されない場合があり、そのような場合には、分離展開条件が支持媒体上で局部的に異なってくるため、得られる分離展開列に歪みが生じがちである。

従って、前記のような各分離展開列の比較による各塩基特異的切断分解物の展開位置の同定操作において、それぞれの展開位置の対応関係を誤りなく決定することは必ずしも容易とは言えず、このため上記の同定操作は従来のオートラジオグラフィーを利用したDNAもしくはDNA部分分解物の塩基配列決定法における大きな問題点とされている。

本発明は、以上に述べたような従来のオートラジオグラフィーを利用したDNAもしくはDNA部分分解物の塩基配列決定のための操作における問題点を排除する塩基配列決定法を提供するものである。

本発明は、DNAもしくはDNA部分分解物に放射性標識を付与したのち、これを塩基特異的切断分解にかけることにより得られる放射性標識を有する切断分解物を支持媒体上で分離展開し、これにより得られる分離展開列を放射線フィルム上に可視画像として得て、該可視画像上に現われた該塩基特異的切断分解物の分離展開位置に基づいてDNAもしくはDNA部分分解物の塩基配列を決定する方法において、

放射性標識を有する塩基特異的切断分解物を支持媒体上で分離展開する際に、DNAもしくはDNA部分分解物をその構成単位である四種類の塩基についてその各々の塩基ごとに特異的に切断して得た切断分解物の混合物を同一の支持媒体上で同時に平行して分離展開し、該混合物の分離展開列に現われた各分離展開位置を標準として他の分離展開列に現われた塩基特異的切断分解物の分離展開位置を比較同定する工程を含むことを特徴とするDNAもしくはDNA部分分解物の塩基配列決定法からなるものである。

たとえば、次の文献に見られる。

METHODS IN ENZYMOLOGY, VOL. 65, PART I
(ACADEMIC PRESS, NEW YORK LONDON TORONTO
SYDNEY SAN FRANCISCO, 1980)

また、上記放射性標識物質を支持媒体を用いて分離展開するための方法の例は、上記の文献にも記載されているが、たとえば、ゲル状支持媒体（形状は層状、柱状など任意）、アセテートなどのポリマー成形体、あるいは濾紙などの各種の支持媒体を用いる電気泳動、そしてシリカゲルなどの支持媒体を用いる薄層クロマトグラフィーがその代表的な方法として挙げられる。このうちで、高分子物質のゲルから形成された支持媒体を用いる電気泳動法が好ましい方法である。

以下、本発明のDNAもしくはDNA部分分解物の塩基配列の決定法を、前記のマキサム・ギルバート法を利用したDNAの塩基配列決定法を例にとり、その塩基配列決定のための典型的な塩基特異的切断分解物の組合せとして次の五種類の切断分解物（もしくは切断分解物混合物）を用いた

次に本発明を詳しく説明する。

本発明の塩基配列決定法の対象とされるDNAもしくはDNA部分分解物は、従来のオートラジオグラフィーを利用したDNAもしくはDNA部分分解物の塩基配列決定法に利用されているものと同様であり、特に限定はない。すなわち、各種のDNA、およびそれらのDNAを任意の位置で切断した部分分解物が含まれる。また、それらのDNAもしくはDNA部分分解物に放射性標識を付与する操作、およびDNAもしくはDNA部分分解物に放射性標識を付与して得た放射性標識物質を塩基特異的切断分解にかけることにより放射性標識を有する塩基特異的切断分解物を得る操作についても既に公知である。

すなわち、上記の操作についての簡単な記述は、たとえば、次の文献に示されている。

「遺伝情報を原語で読む・意表を衝いたDNAの塩基配列解析法」三浦隆一郎、現代化学、1977年9月号46～54頁（読東京化学同人刊）

また、上記の操作についての詳細な記述は、た

場合について説明する。

- 1) グアニン(G)特異的切断分解物
+ アデニン(A)特異的切断分解物
+ チミン(T)特異的切断分解物
+ シトシン(C)特異的切断分解物、
- 2) グアニン(G)特異的切断分解物、
- 3) グアニン(G)特異的切断分解物 + アデニン(A)特異的切断分解物、
- 4) チミン(T)特異的切断分解物 + シトシン(C)特異的切断分解物、
- 5) シトシン(C)特異的切断分解物、

すなわち、上記の1)の混合物が、四種類の塩基特異的切断分解物含むものであり、標準となる分離展開列の形成に用いられる。

まず、対象のDNAに対して³²Pによる放射性標識を付与し、これを常法により化学的手段を用いて、DNAの構成単位である四種類の塩基についてその各々の塩基ごとに特異的な分解を行なわせて、上記2)～5)の塩基特異的切断分解物（各々には放射性標識が付されている）を得る。

次に、これらの塩基特異的切断分解物を適宜混合することにより、上記1)の混合物を得る。

次いで、上記1)の混合物、および2)～5)の特異的切断分解物を同一のゲル支持媒体上で電気泳動により平行に分離展開させて、上記混合物およびそれぞれの塩基特異的切断分解物の分離展開列(ただし、目には見えない)を得る。

次に、この分離展開列が形成された支持媒体とX線フィルムとを低温(たとえば $-70 \sim -90$ ℃)にて数日間重ね合わせることにより露光操作を行なったのち、このX線フィルムを現像することによりX線フィルム上にオートラジオグラフ(可視画像)を得る。

第1図は、放射性標識が付与されたDNAの塩基特異的切断分解物およびそれらの混合物がそれぞれ分離展開されて形成された五列の分離展開列(泳動列)を示すオートラジオグラフを示す。

すなわち、第1図において第1列から第5列は順に、

(1) - (G) 特異的切断分解物

での塩基特異的切断分解物が含まれているから、第2列に現われる(G)特異的切断分解物と(A)特異的切断分解物の全ての分離展開物の展開位置は、内部標準列に現われた分離展開物の一部に対応するはずである。従って、第2列の分離展開物の全てを内部標準列の分離展開物に対応させることによって内部標準列と第2列とのずれを容易に補正することができる。

次に、第3列の内部標準列と、その隣りの第4列の分離展開列とを比較する。内部標準列には全ての塩基特異的切断分解物が含まれているから、第4列に現われる(T)特異的切断分解物と(C)特異的切断分解物の全ての分離展開物の展開位置は、内部標準列に現われた分離展開物の一部に対応するはずである。またさらに、第2列と第4列は互いに排他性をもつものであるから、この点をも利用することにより更に確実に第4列の分離展開物の全てを内部標準列の分離展開物に対応させることができる。このようにして、第4列の分離展開物の全てを内部標準列の分離展開物に対応

(2) - (G) 特異的切断分解物

+ (A) 特異的切断分解物

(3) - (G) 特異的切断分解物

+ (A) 特異的切断分解物

+ (T) 特異的切断分解物

+ (C) 特異的切断分解物

(4) - (T) 特異的切断分解物

+ (C) 特異的切断分解物

(5) - (C) 特異的切断分解物

の各分離展開列を示す。

上記の分離展開列のうち第3列は、(G、A、T、C)の全ての塩基特異的切断分解物を含んだ混合物の分離展開列であり、この分離展開列を塩基配列決定のための内部標準列(基準列)として利用する。

以下に、各分離展開列において帯状にて示される分離展開物を上記の内部標準列を利用して同定する方法の例を示す。

まず、第3列の内部標準列と、その隣りの第2列の分離展開列とを比較する。内部標準列には全

させることによって内部標準列と第4列とのずれは容易に補正することができる。

次いで、第2列と第1列の分離展開列をそれぞれ比較することにより(G)特異的切断分解物と(A)特異的切断分解物の展開位置を同定することができ、また、第4列と第5列の分離展開列を同様に比較することにより(T)特異的切断分解物と(C)特異的切断分解物の展開位置を同定することができる。なお、これらの各塩基特異的切断分解物の同定操作において、前記のようにして求めた各分離展開列の間のずれの程度を適宜参考にすれば、それらの比較および同定は非常に容易となり、またその精度も向上する。

すなわち、以上に例示された本発明のDNAもしくはDNA部分分解物の塩基配列決定法によれば、従来のG、G+A、T+C、Tからなる四群の各塩基特異的切断分解物の分離展開操作に基づく方法、あるいはG、A、T、Cからなる四群(四種類)の各塩基特異的切断分解物の分離展開操作に基づく方法を利用する操作に比較して、DNA

AもしくはDNA部分分解物の各塩基特異的切断分解物の同定操作は非常に容易となり、またその精度も顕著に向上する。

なお、上記の説明においては、内部標準列となる混合物の分離展開列を中央に配置する例を示したが、この内部標準列は必ずしも中央に配置する必要はなく、他の分離展開列に対して任意の位置に配置することもできる。

また、内部標準列は複数個配置することができる。たとえば、内部標準列を通常分離展開列と交互に配置するようにすれば本発明によるDNAもしくはDNA部分分解物の各塩基特異的切断分解物の同定操作は更に容易となり、またその精度も更に顕著に向上する。

なお、本発明のDNAもしくはDNA部分分解物の塩基配列決定法においては、上記の(G+A+T+C、G、A+G、T+C、C)の組合わせを利用したDNAの塩基配列決定法は、DNAの塩基配列決定方法の一例であって、本発明の塩基配列の決定法は、上記の組合わせに限定されるも

- (b) : (G) 特異的切断分解物、
 + (A) 特異的切断分解物、
 + (T) 特異的切断分解物、
 + (C) 特異的切断分解物

の組合わせを用いてDNAもしくはDNA部分分解物におけるグアニン(G)のみについてその位置を決定することもできる。

すなわち、本発明においてDNAもしくはDNA部分分解物の塩基配列の決定とは、全ての塩基についての塩基配列の決定のみを意味するものではなく、上記のように一部の塩基のみの位置を決定することも含むものである。

なお、これまでの記述は一つの支持媒体を用いて一種類のDNAもしくはDNA部分分解物の塩基配列の決定を行なう例を示すものであったが、一つの支持媒体を用いて同時に二種類以上のDNAもしくはDNA部分分解物の塩基配列の決定を行なうことも可能である。

また、放射線フィルム上に可視画像として得られたオートラジオグラフの解析は人間の目により

のではなく、種々の組合わせが可能であり、またその組合わせを利用して、上記の方法に準じる方法により同様にして塩基配列を決定することができ

る。

すなわち、たとえば、放射性標識を有する塩基特異的切断分解物の組合せとして、

- グアニン(G) 特異的切断分解物、
 アデニン(A) 特異的切断分解物、
 チミン(T) 特異的切断分解物、
 シトシン(C) 特異的切断分解物、

からなる四群の切断分解物からなる組合せを利用することも可能である。

また、前記の例においては、支持媒体上で一次元的方向に分離展開して分離展開列を形成している五列の放射性標識物質群を用いて説明したが、分離展開列は五列に限定されるものではなく、五列より多くてもよく、また五列より少なくともよい。

すなわち、たとえば、

- (a) : (G) 特異的切断分解物、および

行なうこともできるが、スキャニングデンストメーターなどの器具を用いて測定する方法を利用してもよい。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、放射性標識が付与されたDNAの塩基特異的切断分解物およびその混合物が支持媒体上で分離展開されて形成された分離展開列(泳動列)を示すオートラジオグラフの模式図である。

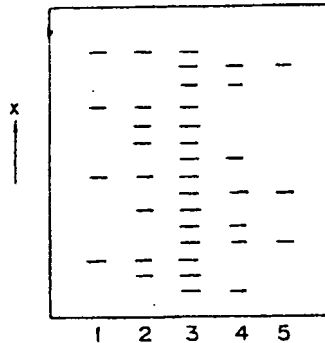
特許出願人 富士写真フィルム株式会社
 代理人 弁理士 柳川泰男

昭和58年1月25日

特許庁長官 若杉和夫 殿

図面の浄書(内容に変更なし)

第 1 図



1. 事件の表示

55-001335

昭和58年1月8日提出の特許願(15)

2. 発明の名称

DNAもしくはDNA部分分解物の塩基配列決定法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 (520) 富士写真フイルム株式会社

氏名 代表者 大 西 寛

4. 代理人

住所 東京都新宿区四谷2-14 ミツヤ四谷ビル8階
(358)1798/9

氏名 (7467) 弁理士、柳 川 泰 男

5. 補正命令の日付

(自 発)

6. 補正により増加する発明の数

なし

7. 補正の対象

図面

8. 補正の内容

正式図面を提出する。

